

(42) 河口・沿岸域におけるフミン鉄の錯平衡と凝集特性

Equilibrium and Coagulation Characteristics of Humic Iron Complex in Estuaries

藤井学*, 佐々木陽*, 渡部徹*, 大村達夫*

Manabu FUJII*, Akira SASAKI*, Toru WATANABE*, Tatsuo OMURA*

ABSTRACT; Humic iron complex is one of the most essential minerals for the growth of aquatic organisms in estuaries. However, the behavior of humic iron complex has not been known so well in estuaries where salinity widely changes. In this study, the effect of salinity on the behavior of humic iron complex was investigated with the Dando humic and fulvic acids. The increase of salinity, especially divalent cations such as magnesium and calcium ions, enhanced the coagulation of humic substances (HS). When the salt concentration increased from 0 to 30g/L, 81% of dissolved humic acid (HA) and 18% of dissolved fulvic acid (FA) transformed to the particulate ($>0.45\mu\text{m}$) due to the coagulation. Gel chromatography analysis with UV spectrometer (254nm) revealed that high molecular weight and hydrophobic fractions of humic substances were important factors relevant to the coagulation. The increase of salinity also enhanced the dissociation of iron from HA and FA. With the increase of salt concentration from 0 to 30g/L, 98% and 88% of iron dissociated from HA and FA, respectively. It was expected that amino and sulfo groups on the surface of HA and FA which possess a high affinity with iron contributed to the subsistence of dissolved iron in estuaries.

KEY WORDS; *Humic and fulvic acids, Iron, Estuary, Coagulation, Equilibrium*

1. はじめに

地球上の植物の光合成による有機物質生産量の5%を河口・沿岸域が占める¹⁾。河口・沿岸域が非常に狭い水域であることを考慮すると、そこでの生物生産量は高く、他の水域と比べ豊かな生態系が形成されていることが分かる。この高い生物生産性から、日本をはじめ世界各地の河口・沿岸域は、古くから魚介類の養殖の場として利用されてきた。河口・沿岸域で生物生産性が高い理由は、陸域由来の栄養塩や有機物質、微量金属などが豊富に存在し、海洋に生息する植物プランクトンや海藻群落の生長に最適な水域であることによる²⁾⁻⁵⁾。微量金属の中でも溶存鉄は、食物連鎖の根底を担う一次生産者が窒素固定や光合成を行う際に不可欠な必須金属であり、多くの海洋や河口・沿岸域において水生生物の生長制限要素となっている⁶⁾⁻¹¹⁾。しかし、近年、各地の河口・沿岸域において、流域の森林伐採に起因する溶存鉄の供給減少により、生物生産性が低下している事例が報告されており、河口・沿岸域生態系の崩壊が危ぶまれている^{2),3)}。豊かで健全な河口・沿岸域生態系の保全のためには、従来の環境保全に関わる水質基準である窒素やリン、有機物質を対象とした水質管理だけでは不十分であり^{4),5)}、流域での鉄の発生や流下過程での挙動に着目する必要がある。その上で、流域における森林伐採や都市開発、ダム建設などの人間活動が河口・沿岸域生態系へ与える影響を的確に評価した流域管理を行っていくことが望まれる。

一般的な河口・沿岸域(pH=6~8)において、鉄はフミン物質を代表とする有機物キレートと錯体を形成しながら生物利用可能な溶存態として存在する¹²⁾⁻¹⁴⁾。ここで、フミン物質とは動植物の遺骸が生物分解を経て生成される安定した有機物であり^{15),16)}、一般的な河川水中では溶存態有機物質(DOM)の半分以上を占める^{17),18)}。河口・沿岸域に存在する溶存鉄の多くは、陸域で発生し河川を経て供給されるフミン鉄(フミン物質と錯体を形成した溶存鉄)と考えられている^{19),20)}。また、Dee'nら(2002)²⁰⁾は、北海道の3河川における有機物質の炭素安定同位体比を測定し、それが山地由来であると報告し

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

ている。河口・沿岸域では、様々な金属イオンが高濃度で存在し、潮流が時々刻々と変化するため、河川から供給されるフミン鉄は錯平衡の変化や凝集の影響により、複雑な挙動を示すことが予想される。しかし、その挙動に関する研究例は少なく、未だ本質的な議論が行われていない。

以上のような背景から、本研究では河口・沿岸域における陸域由来フミン鉄の挙動を解明することを目的とする。具体的には、これまでに性質や構造がある程度解明されている標準フミン物質（段戸土壌由来フミン酸及びフルボ酸）と鉄の錯平衡実験を行い、河口・沿岸域で想定される塩濃度条件下でフミン鉄の錯平衡と凝集に関する解析を行った。それと同時に、河口・沿岸域条件下での凝集に関与するフミン物質の性質を調べるため、凝集前後の溶存態フミン物質について疎水性の強さを示す指標である E254/TOC、C/N 比、分子量分布の測定を行った。

2 実験方法

2.1 フミン物質試料

フミン物質は、酸性溶液中での溶解性の違いにより、pH=2 で沈殿するフミン酸と、すべての pH で溶解するフルボ酸に分類される¹⁷⁾。本実験では、日本腐植学会が提供している愛知県段戸森林土壌 (Dystric Cambisol, Dando, Aichi) 由来フミン酸及びフルボ酸を使用した。Watanabe ら (1994) は、これらのフミン物質について、元素分析、官能基分析、¹³CNMR スペクトル分析を行っている²¹⁾。この土壌フミン物質は河口域に存在する水生フミン物質と含有元素の比率が異なることが知られているが、両フミン物質とも酸性官能基を多数有し、比較的高分子で、芳香族特性が高いという一般的な性質は類似している^{19), 17)}。従って、河口域条件下での鉄との錯平衡や凝集特性については、両者に大きな相違は見られないものと考え、土壌フミン物質を使用することとした。

2.2 鉄濃度の測定手法

鉄濃度は発光試薬 Ferrozine (Disodium salt of 3-(2-pyridyl)-5, 6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1, 2, 4-triazine) を用いて比色分析により測定した²²⁾。Ferozine は他の発光試薬 (TPTZ や 1,10-phenanthroline) を用いた比色分析法より精度が高く (検出限界 0.05 μM)、第一鉄イオン (Fe²⁺) と強く結合することで、pH=4~10 において赤紫色を呈し、波長 562nm で最大の吸光を示すことが知られている^{23), 24)}。以下に Ferrozine を用いた溶存鉄濃度の測定方法を示す。

はじめに、実験で使用するすべてのガラス容器を希硝酸に数時間浸し洗浄した。少量の MilliQ に Ferrozine (ACROS) 5.14g とヒドロキシルアミン塩酸塩 (Kanto Chem.) 100g を加え、さらに、500mL の 36 %濃塩酸 (Kanto Chem.) と MilliQ を加え 1L にメスアップし、20℃まで冷却したものを発光試薬とした。この発光試薬 1.0mL とサンプル 25mL を 100mL フラスコに加え、ホットプレートを用いて沸点で 20 分間加熱し続けた。その後、サンプルを 20℃に冷却した後、酢酸アンモニウムバッファー溶液 (pH=5.5, Kanto Chem.) を 1.0mL 加え、MilliQ で 25mL にメスアップした。10 分後、分光光度計 (Shimadzu UV-1600) を用いて波長 562nm の吸光度を測定した。1g/L 硝酸第二鉄溶液 (Kanto Chem.) を用いて、上記の方法により鉄濃度の検量線を作成した。

本研究で対象とする河口・沿岸域のような高塩濃度でフミン物質が存在する溶液中において、Ferozine を用いた鉄濃度測定方法の有効性を確認するため、人工海水中において鉄濃度の測定を行った。ここで、人工海水 (30g/L) とは、Na, Mg, Ca のモル濃度比が 45.6:5.4:1 になるよう、NaCl (Kanto Chem.), MgCl₂·6(H₂O) (Kanto Chem.), CaCl₂·2(H₂O) (Kanto Chem.) を MilliQ 1L にそれぞれ 24.3g, 10.0g, 1.34g 加えたものを指す。一般的に海水中に存在する主な金属イオンとして Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ があり、そのうち、Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ が重量比で 96.8% を占める¹²⁾。残りの 3.1% を占める K⁺ は一価のイオンであるため、フミン物質の凝集や錯平衡へ与える影響は Na⁺ と同等で比較弱い。一方、Sr²⁺ は二価のイオンで一価よりも強い電気的引力を持っているが、その重量比は 0.06% と非常に小さいため、その影響も無視できるほど小さい。従って、人工海水に含まれる金属イオンがフミン物質の凝集やフ

ミン鉄の錯平衡へ与える影響は実際の海水とほぼ同等であると考えられる。1g/L 硝酸鉄水溶液 1mL を MilliQ で 35.8mL にメスアップし 0.5mM 硝酸第二鉄溶液を用意した。この 0.5mM 硝酸第二鉄溶液 2.0mL と 100mg/L フミン酸またはフルボ酸溶液 2mL を 30g/L 人工海水 96mL に加え、NaOH(Kanto Chem.)を用いて pH を 8 に調整し、この溶液の鉄濃度を Ferrozine により測定した。このときフミン酸またはフルボ酸濃度は 2mg/L、鉄濃度は 10.0 μ M となる。

2.3 フミン物質炭素濃度の測定手法

フミン物質の炭素濃度は二通りの方法で測定した。サンプルの塩濃度が低い(約 5g/L 以下)場合、フミン物質の炭素濃度は TOC 計(Shimadzu TOC-5000)により測定した。一方、高塩濃度のサンプルの炭素濃度を TOC 計により測定する場合、TOC 計の燃焼カラムに塩分が固着してしまうため、測定値に誤差が生じてしまう。塩濃度が高い(約 5g/L 以上)サンプルについては、紫外線分光光度計(Shimadzu UV-1600)によりフミン物質の炭素濃度を推定した。フミン物質は芳香族や二重結合などの不飽和結合を含む割合が高いため、紫外線波長 250 ~ 280nm の光エネルギーを吸収することが知られている^{25),26)}。本研究では、フミン物質炭素濃度の測定に波長 254nm を採用した²²⁾。

ただし、フミン物質と同様に、鉄も波長 254nm で吸光を示すことが知られている。そこで、本研究で対象とするフミン物質と鉄が混在した実験系で、フミン物質濃度を正確に算出するためには、溶液中に存在する鉄が示す 254nm 吸光度を測定し、溶液全体の 254nm 吸光度から差し引かなければならない。溶液中に存在する鉄が示す 254nm 吸光度と鉄濃度の関係は、以下の手順で確認した。100mg/L フルボ酸溶液と 0.5mM 硝酸第二鉄溶液を混合し、フルボ酸濃度が 1, 2 または 4mg/L で、鉄濃度を 0.0 から 25.0 μ M まで変化させた溶液を用意した。NaOH で pH=8 に調整した後、100mL ポリエチレンボトル(Samplatec)に移し、20℃の暗室で 72 時間、攪拌台により攪拌を行った。その後、0.45 μ m メンブレンフィルターでサンプルの濾過を行い、濾液の鉄濃度及び 254nm 吸光度の測定を行った。本研究では、粒径が 0.45 μ m 以下のものを溶存態、0.45 μ m 以上のものを粒子状態と定義する。

また、フミン物質はポリエチレンボトルやメンブレンフィルターに吸着することが知られている。本研究では予備実験として、ポリエチレンボトルに 2mg/L フミン物質溶液(pH=8、鉄濃度:0 μ M、海水塩濃度:0g/L)を加え、3 日間攪拌を行い、その実験前後において溶液中のフミン物質濃度を測定した。その結果、実験前後のフミン物質濃度に有意な差(T 検定, $p < 0.05$)は見られなかった。一方、フミン物質の 0.45 μ m メンブレンフィルターへの吸着量を測定するため、0.45 μ m メンブレンフィルターで濾過前後の 2mg/L フミン物質溶液(pH=8、鉄濃度:4 μ M、海水塩濃度:0g/L)について、フミン物質濃度を測定した。その結果、濾過前後のフミン物質濃度に有意な差(T 検定, $p < 0.05$)は見られなかった。以上の結果から、フミン物質のポリエチレンボトルやメンブレンフィルターへの吸着量は無視できる範囲であり、本研究においてフミン物質の濃度や性質の変化に与える影響は無視できると考えている。

2.4 凝集前後におけるフミン物質の性質の分析

塩濃度が高い河口・沿岸域においてフミン物質は凝集するが、その凝集前後によるフミン物質の性質(E254/TOC, C/N 比, 分子量分布)変化を検討するため、以下に示す手順で実験を行った。この実験ではゲル濾過クロマトグラフィーを用いてフミン物質の分子量分布を測定するため、フミン酸またはフルボ酸濃度は 100mg/L と非常に高くした。フミン酸またはフルボ酸濃度 100mg/L、塩濃度 30g/L の人工海水(人工海水の内容は前述の通り)を 10mL ずつ 30mL ポリエチレンボトル(Samplatec)に加えたものを 5 つ用意した。10mM 塩化第二鉄溶液(Kanto Chem.)をそれぞれ 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0mL ずつサンプルに加え、NaOH により pH を 8 に調整した。20℃の暗室で、攪拌台により 72 時間攪拌(100rpm)を行った後、0.45 μ m メンブレンフィルターでサンプルの濾過を行い、10 倍希釈した濾液について有機炭素濃度(Shimadzu TOC-5000)、有機窒素濃度、254nm 吸光度(Shimadzu UV-1600)を測定した。有機窒素濃度は、アルカリ性下でペルオキシ二硫酸カリウム(Kanto Chem.)により酸化分解して生成した硝酸

性窒素を、硝酸性窒素試験法に従って Auto Analyzer II (Technikon) により測定した²²⁾。

分子量分布の測定に関しては、凝集後に形成されているフミン物質コロイドを分離させるため、サンプルの濾液2mLを透析膜(Spectra/Pro CE, MWCO:1.0kDa)に加え、0.01M塩酸3L中で3日間、MilliQ2L中で3日間透析を行った。その後、ゲル濾過クロマトグラフィー(AKTA FPLC)により分子量分布を測定した。フルボ酸及びフミン酸の分子量測定用のゲルクロマトカラムとして Superdex peptide HR10/300 (分子量分画範囲:0.1 ~ 7.0kDa) と Superdex 200 HR10/30 (分子量分画範囲:10 ~ 600kDa) をそれぞれ用いた。試料0.5mLを流速0.5mL/minでゲルクロマトカラムに導入し、カラムの出口において254nm吸光度を測定した。バッファーにはMilliQ 1LにNaCl(Kanto Chem.)を8.77g, Na₂HPO₄(Kanto Chem.)を7.1g加え、HClによりpHを7.0に調整したものを用いた。このとき、バッファー中のNaCl濃度は0.05M, Na₂HPO₄濃度は0.15Mである。標準分子量マーカーとしてはポリエチレングリコール(M.W. 4.02kDa, 1.08kDa, 0.62kDa) (Polymer Laboratories)及びLMW Gel Filtration Calibration Kit (内容は、Ribnuclease A (M.W. 13.7kDa), Chymotrypsinogen A (M.W. 25kDa), Ovalbumin (M.W. 43kDa), Bovine Serum Albumin (M.W. 67kDa), 多糖類 1 種類 Blue Dextran 2000 (M.W. 2000kDa) である)(Biotec)を用いた。

一方、上記の実験に用いた100mg/Lフミン酸またはフルボ酸溶液を同様の条件でゲルクロマトカラムに導入し、溶出液を1mLずつ分取した後、その有機炭素濃度と254nm吸光度を測定した。

2.5 実際の河口・沿岸域を想定したフミン鉄の錯平衡実験

塩濃度変化に伴うフミン鉄の錯平衡変化と凝集を検討するため、実際の河口・沿岸域を想定した塩濃度0 ~ 30g/L、フミン酸及びフルボ酸濃度2mg/L、鉄濃度4.0μMの条件下で、錯平衡実験を行った(図1)。人工海水とMilli-Qを混合することで塩濃度が0, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 30g/Lの人工海水を作成した。各塩濃度の人工海水97.2mLに0.5mM標準第二鉄溶液0.8mLと100mg/Lフミン酸またはフルボ酸溶液2mLを加え、NaOH溶液を用いてpHを8に調整した。このとき、フミン酸またはフルボ酸濃度は2mg/L、鉄濃度は4μMとなる。その後、サンプルをポリエチレンボトル(Samplatec)に加え、20℃の暗室で72時間攪拌した。攪拌後のサンプルを0.45μmメンブレンフィルターで濾過し、濾液について鉄濃度と254nm吸光度を測定した。一方で、塩濃度30g/Lの人工海水の他に、Mg²⁺やCa²⁺の影響を調べるため、これらのイオンを含まない同じ塩濃度30g/LのNaCl溶液を用意し、上記と同様の条件でフミン鉄の錯平衡実験を行った。

3 実験結果と考察

3.1 Ferrozineを用いた鉄濃度測定の精度

Ferrozineを用いた鉄濃度分析から得られた、鉄濃度と562nm吸光度の関係を図2に示した。鉄濃度と562nm吸光度には、有意な線形関係(R²=1.00, p<0.05)がみられた。また、Ferrozineを用いた鉄濃度分析におけるフミン物質と海水塩の影響を表1に示した。ここで、添加した鉄濃度に対する測定された鉄濃度の割合(%)を鉄濃度の回収率と定義した。表1から、すべての条件において鉄濃度の回収率は95%以上、標準誤差は3.2%以下であり、Ferrozineを用いた鉄濃度分析に対するフミン物質と海水塩の影響は小さかった。従って、本実験条件下(pH=8, 塩濃度30g/L, フミン物質濃度2mg/L)における鉄濃度の測定にFerrozineを用いた鉄濃度分析は有効である。

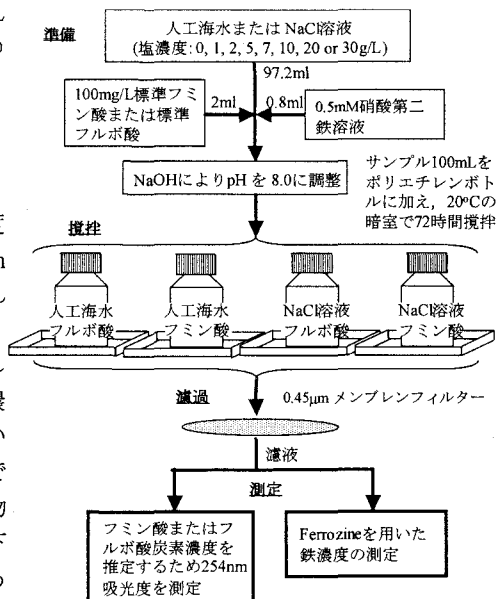


図1. 実際の河口・沿岸域を想定したフミン鉄の錯平衡実験のフローチャート。

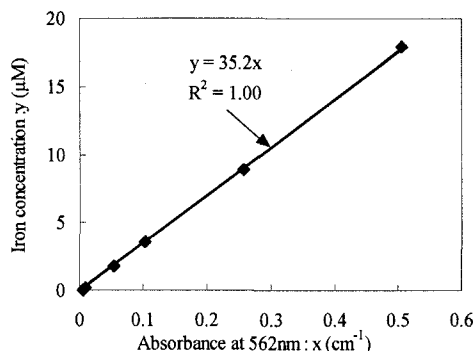


図2. Ferrozineを用いた鉄濃度分析から得られた、鉄濃度と562nm吸光度の関係。

3.2 吸光度によるフミン物質炭素濃度の推定

図3は塩濃度0g/L, pH=8.0の条件下における、フルボ酸及びフミン酸炭素濃度と254nm吸光度の関係を示している。フミン物質炭素濃度と254nm吸光度には有意な線形関係($R^2=1.00$, $p<0.05$)が見られ、254nm吸光度からフミン物質炭素濃度の推定が可能であることが分かる。

続いて、フミン物質の254nm吸光度を測定する際に、サンプル溶液中に存在する鉄(第二鉄イオン、水酸化鉄イオン、フミン鉄)が及ぼす影響について検討を行った。図4は、塩濃度0g/L, pH=8, フルボ酸濃度が1, 2または4mg/Lの条件下で、溶液の鉄濃度を变化させた場合における、溶液中の溶存鉄とフルボ酸が示す254nm吸光度と溶存鉄濃度の関係を表す。この実験条件において、フルボ酸は凝集しないため、図4における回帰直線の切片がフルボ酸が示す254nm吸光度となる。この値は、鉄濃度に依らず一定であるので、溶液中の溶存鉄が示す254nm吸光度と溶存鉄濃度には有意な線形関係(すべて $R^2>0.99$, $p<0.05$)があったことが分かる。以上の結果から、溶液中の溶存鉄濃度を測定することで、溶存鉄が示す254nm吸光度を算出することができるため、溶液中のフミン物質が示す254nm吸光度を算出することが可能である。

3.3 凝集前後におけるフミン物質の性質変化

高い塩分を含む人工海水中でフミン物質と鉄の平衡実験を行うと、実験後にフミン物質の一部は凝集し粒子状態($>0.45\mu\text{m}$)へ変化する。この節では、標準フミン酸とフルボ酸に対してE254/TOC, C/N比, 分子量分布を測定し、高塩濃度の河口・沿岸域で凝集するフミン物質の性質を明らかにした。

(1) E254/TOC の変化

一般的に、疎水性物質を多く含む有機物ほど、疎水性相互作用(引力)が生じやすいため、凝集を起こしやすい²⁷⁾。従って、平衡実験後に存在する溶存態フミン物質は、親水性が強いフミン物質であると考えられる。そこで、平衡実験後に溶存態として存在するフミン酸とフルボ酸に関して、疎水性

表1. Ferrozineを用いた鉄濃度測定におけるフミン物質と海水塩の影響(実験条件: pH=8, 塩濃度30g/L, フミン物質濃度2mg/L) HAはフミン酸, FAはフルボ酸を表す。SDは標準誤差を表す(n=3)。

Experimental Condition	Input of iron concentration	Iron concentration measured by using ferrozine		Recovery rate of iron concentration	
	Average(μM)	Average(μM)	SD	Average(%)	SD
Seawater	36.0	36.0	1.15	99.9	3.20
Seawater + HA	36.0	35.9	1.15	99.8	3.19
Seawater + FA	36.0	34.5	0.67	95.8	1.87

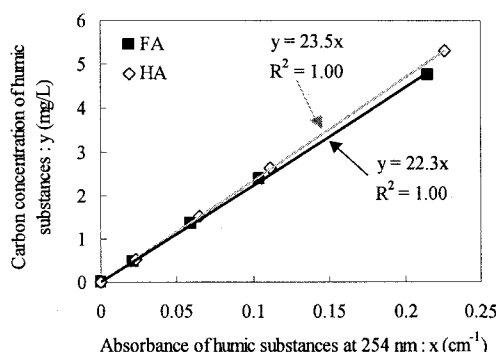


図3. 塩濃度0g/L, pH=8の条件下における、フミン酸及びフルボ酸炭素濃度と254nm吸光度の関係。HAはフミン酸, FAはフルボ酸を表す。

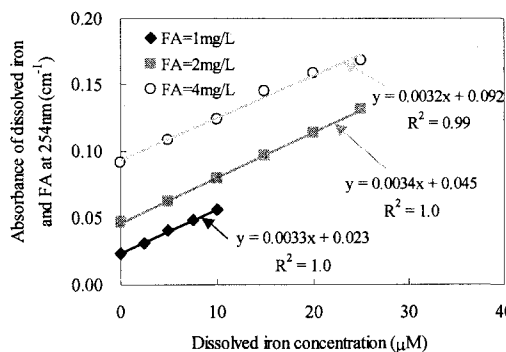


図4. 塩濃度0g/L, pH=8, フルボ酸濃度1, 2または4mg/Lの条件下における、溶液中の溶存鉄とフルボ酸が示す254nm吸光度と溶存鉄濃度の関係。

の強さを示す指標である E254/TOC を測定した。

図 5 に、pH=8、塩濃度 30g/L、フミン酸またはフルボ酸濃度 100mg/L の溶液中で鉄濃度を变化させた場合における、溶存態フミン物質の割合と溶存態フミン物質の E254/TOC の関係を示した。ただし、溶存態フミン物質の割合が 1 の場合は、フミン物質の凝集が全く起こらない条件、すなわち塩濃度 0g/L で鉄を添加していない溶液中における E254/TOC を示している。溶存態フミン物質の割合は、平衡状態において、溶液中に存在する全フミン物質炭素濃度に対する溶存態フミン物質炭素濃度の割合と定義した。高塩濃度下において鉄のほとんどはフミン物質から解離し、水酸化鉄フロックを形成する。水酸化鉄フロックは架橋作用によりフミン物質を凝集させる働きを持つため、溶液への鉄の添加量の増加はフミン物質の凝集を促進させ、結果的に溶液中に存在する溶存態フミン物質の割合を低下させる。すなわち、図 5 において、溶存態フミン物質の割合が高いほど鉄の添加量が少く、溶存態フミン物質の割合が低いほど鉄の添加量が多いことを示している。

図 5 においてフルボ酸の場合について見てみると、溶存態フルボ酸の割合が 1 から 0.4 まで減少するに伴い E254/TOC は 0.049 から 0.031 まで減少した。フミン酸の場合も同様に、溶存態フミン酸の割合が 1 から 0.1 まで減少するに伴い E254/TOC は 0.052 から 0.011 まで減少した。以上のように、全体的な傾向として、溶存態フミン物質の割合が減少するほど E254/TOC は減少していた。すなわち、フミン物質の疎水性部分が凝集したため、溶存態フミン物質の E254/TOC は減少したといえる。溶存態フミン物質と E254/TOC の関係について、溶存態フミン物質の割合が比較的高い場合 (0.7~1.0)、溶存態フミン物質の割合が減少するに伴い E254/TOC は一定または若干の減少傾向を示し、また、溶存態フミン物質の割合が比較的低い場合 (0.2~0.7)、溶存態フミン物質の割合が減少するに伴い E254/TOC は急激な減少を示した。これは、凝集するフミン物質量が少ない場合、フミン物質の疎水性部分は凝集に比較的関与せず、一方で大量に凝集する場合、疎水性部分が深く関与していることを示している。フミン物質の分子量が大きいほど分子間に働く引力が大きいことを考慮すると、疎水性部分に比較的関与せず凝集したフミン物質は、分子量が大きいものであったことが推測される。

(2) C/N 比の変化

フミン物質中に含まれる窒素原子の起源は主にタンパク質であるが、その多くがリグニンやセルロースと結合しているため、難分解性 (生物利用性は 1-27%)²⁸⁾ の疎水性窒素として存在する²⁹⁾。そのため、窒素原子を多く含むフミン物質ほど疎水性が強く、凝集しやすい傾向にあると考えられる。

図 6 に平衡実験後に溶存態として存在するフミン物質の E254/TOC と C/N 比の関係を示した。フルボ酸とフミン酸の両ケースにおいて全体的な傾向を見ると、E254/TOC の増加に伴い C/N 比は減少傾向を示した。このことは、窒素を含む割合が高いフミン物質ほど疎水性が強く、凝集を起こしやすいということを端的に示している。フミン酸の場合とフルボ酸の場合を比較すると、E254/TOC の増加に伴う

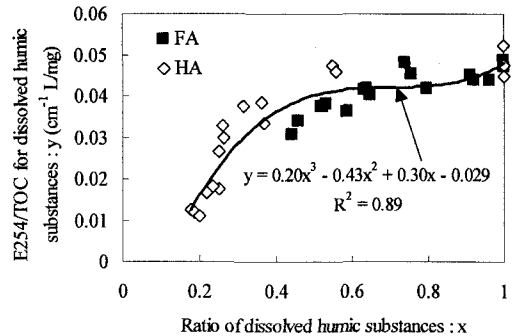


図 5. pH=8、塩濃度 30g/L、フミン酸またはフルボ酸濃度 100mg/L の溶液中で鉄濃度を变化させた場合における、溶存態フミン物質の割合と溶存態フミン物質の E254/TOC の関係。HA はフミン酸、FA はフルボ酸を表す。

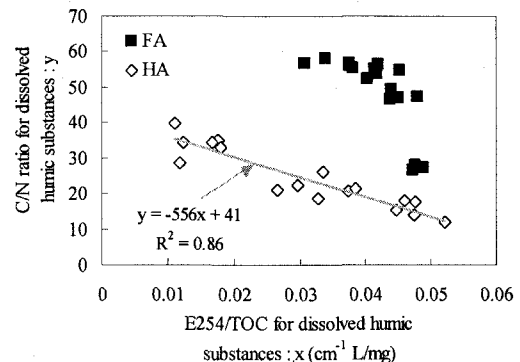


図 6. pH=8、塩濃度 30g/L、フミン酸またはフルボ酸濃度 100mg/L の溶液中で鉄濃度を变化させた場合における、溶存態フミン物質の E254/TOC と C/N 比の関係。HA はフミン酸、FA はフルボ酸を表す。

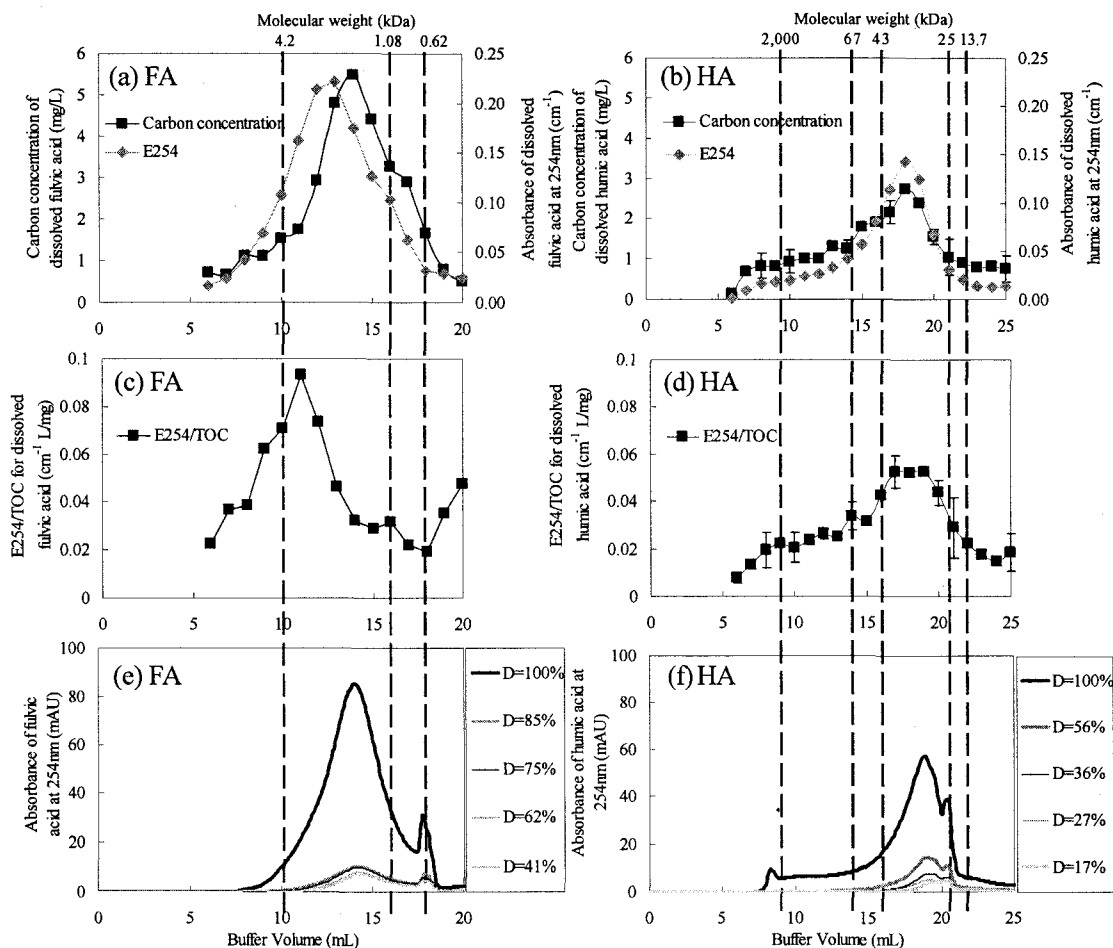


図7.ゲルクロマトグラフィーを用いた分析から得られた、凝集前後におけるフミン物質の性質変化。横軸はすべてバッファボリューム(分子量)を表す。縦軸はそれぞれ、平衡実験前における(a)溶存態フルボ酸の炭素濃度とE254, (b)溶存態フミン酸の炭素濃度とE254, (c)溶存態フルボ酸のE254/TOC, (d)溶存態フミン酸のE254/TOC, 実験後における(e)溶存態フルボ酸のE254, (f)溶存態フミン酸のE254を表す。(e),(f)において、Dは溶存態フミン物質の割合を示す。HAはフミン酸、FAはフルボ酸、エラーバーは標準誤差を表す(n=3)。

C/N比の減少傾向が全く異なっていた。フミン酸の場合、E254/TOCが0.011から0.052まで増加するに伴いC/N比は40から12まで線形的($y = -556x + 41$, $R^2 = 0.86$)に減少した。これは、フミン酸における窒素原子は疎水性のフミン酸に比較的均一に分布しており、疎水性のフミン酸の減少に伴い窒素原子も同様に減少したためだと考えられる。一方、フルボ酸の場合、E254/TOCが0.04以下においてC/N比は一定の値を取っていたが、それ以上において急激な減少を見せた。これは、フルボ酸における窒素原子は疎水性のフルボ酸のうちでも比較的凝集しやすいもの、すなわち、疎水性が強くかつ分子量が高いフルボ酸に含まれていたためだと考えられる。

(3) フミン物質の分子量分布変化

図7(a),(b)に実験前における溶存態フルボ酸及びフミン酸について、分子量(Buffer Volume)と炭素濃度の関係及び分子量とE254の関係を表した。フルボ酸の場合(図7(a)), 炭素濃度とE254ともに、4.02kDaから1.08kDaの範囲でピークを取る凸型の分布を示し、分子量数百Daから4kDa程度の範囲に分布し

ていた。フミン酸の場合(図7(b)), 炭素濃度とE254ともに43kDaから25kDaの範囲でピークを取り、分子量10kDaから600kDa程度の範囲に分布していた。フルボ酸と比較してフミン酸の分子量は大きく、広範囲に分布していることが分かる。Buffer Volume (x) と分子量 (y) を近似線(フルボ酸: $y = -6725 \ln(x) + 19828$, $R^2 = 0.99$; フミン酸: $y = 1679 \exp(-0.2129x)$, $R^2 = 0.98$) で関係付けた後に、各分子量における炭素量の割合から算出したフミン酸とフルボ酸の重量平均分子量はそれぞれ、84kDa、2.4kDaであった。なお、ゲルクロマトグラフィーへ投入したフミン物質と溶出液のフミン物質をE254により求めた結果、回収率はフミン酸で90.0%($\pm 9.0\%$, $n=2$), フルボ酸で104.4%($\pm 5.6\%$, $n=2$)であった。

図7(c), (d) は、溶存態フルボ酸及びフミン酸の分子量とE254/TOCの関係を示している。フルボ酸の場合、E254/TOCのピーク位置は炭素濃度のピーク位置よりも分子量が高かった。一方、フミン酸の場合、E254/TOCのピーク位置は炭素濃度のピーク位置とほぼ同じ分子量であった。E254/TOCのピーク値に関しては、フミン酸(0.052)よりもフルボ酸(0.093)の方が高く、E254/TOCのピーク値をとる分子量ではフルボ酸の方が疎水性が強かった。これは、本実験で用いたフルボ酸がフミン酸より疎水性部分(芳香族炭素やオレフィン系炭素)を高い割合で含む結果と一致していた²¹⁾。

以上のような性質を持つフルボ酸とフミン酸について、高塩濃度条件下で鉄との錯平衡実験を行い、実験後に溶存態として存在するものについて、E254により分子量分布を測定した(図7(e),(f))。図7(e),(f)において凡例のDは溶存態フミン物質の割合を示している。凝集が進み溶存態フミン物質の割合が減少するほど溶存態フミン物質の分子量分布は低分子量に偏っていることから、凝集に関与せず溶存態として残留するフミン物質は比較的分子量が低いものであったことが分かる。フミン酸の場合(図7(f)), 溶存態フミン物質の割合がD=56%以下になると、フミン酸に含まれる67kDa以上の疎水性部分のほぼすべてが粒子状態へ変化してしまった。以上のことは、分子量が大きく、かつ疎水性が強いフミン物質ほど凝集しやすい傾向にあることを示している。

3.4 実際の河口・沿岸域を想定したフミン鉄の錯平衡実験

前節では、高塩濃度の河口・沿岸域条件下において、凝集に関与するフミン物質の性質を明らかにした。実際の河口・沿岸域では塩濃度が大きく変化し、それに伴いフミン物質やフミン物質に吸着している鉄の挙動も変化するため、本節では、溶存鉄濃度、溶存フミン物質濃度及びフミン物質への鉄の吸着量に着目して、塩濃度変化に伴うフミン鉄の挙動(錯平衡と凝集)を明らかにした。

(1) 溶存鉄の割合

図8に塩濃度の異なる人工海水またはNaCl溶液中でフミン物質と鉄の錯平衡実験を行い、それにより得られた、溶存鉄の割合と塩濃度の関係を示した。溶存鉄の割合は、添加した鉄濃度に対する平衡状態での溶存鉄濃度の割合で定義した。この実験条件において、サンプル中には、無機態と有機態の鉄が混在する。無機態の鉄としては鉄イオンや水酸化鉄イオン、水酸化鉄イオンの微小コロイドが考えられる。pH=8における熱力学的平衡定数を考慮すると鉄イオン及び水酸化鉄イオンは 10^{-10}M ($=0.1 \text{nM}$)のオーダーでしか存在しない¹²⁾。また、pHが8、塩濃度が0g/L、フミン物質を含まない条件では、 $0.45 \mu\text{m}$ 以下の微小コロイドを形成する水酸化鉄イオンは検出限界($0.05 \mu\text{M}$)以下であることを確認した。すなわち、フミン物質が存在しないとき、水酸化鉄イオンのほとんどすべてはフロックを形成し、 $0.45 \mu\text{m}$ 以上の粒状態となることが分かった。従って、この実験条件において、 $0.45 \mu\text{m}$ 以下の鉄は、フミン物

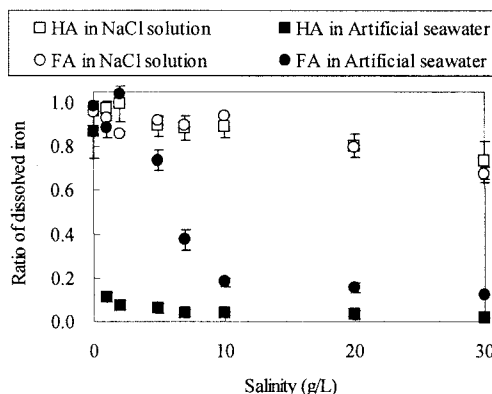


図8. フミン物質と鉄を用いた錯平衡実験により得られた、溶存鉄の割合と塩濃度の関係。HAはフミン酸、FAはフルボ酸、NaCl solutionはNaCl溶液、Artificial seawaterは人工海水を表す。エラーバーは標準誤差を表す($n=3$)。

質と錯体を形成して存在しているとみなすことができる。このようにフミン酸及びフルボ酸と錯体を形成している溶存鉄をフミン酸鉄及びフルボ酸鉄と呼ぶ。図8において、NaCl溶液中におけるフミン酸鉄の割合は、塩濃度2g/Lまでは変化を見せず、その後は塩濃度が増加するに従い、緩やかな減少傾向を示し、塩濃度30g/Lで74%を示した。一方、人工海水中におけるフミン酸鉄の割合は、塩濃度1g/Lの時に11%まで急激に下がり、30g/Lではわずか2%であった。フルボ酸鉄については、NaCl溶液中では、塩濃度10g/Lまでは96%から86%へ減少し、それ以降20g/Lで80%、30g/Lで67%を示した。人工海水中では、塩濃度が10g/Lに増加するまでにフルボ酸鉄の割合は18%まで減少し、それ以降は20g/Lで16%、30g/Lで12%とほぼ一定の値を保っていた。人工海水中でのフミン酸鉄及びフルボ酸鉄に関して、フルボ酸鉄の方がフミン酸鉄に比べて塩濃度増加に伴う減少が緩やかで、塩濃度30g/Lではフルボ酸鉄の割合の方が高い値(フミン酸:2%, フルボ酸:12%)を示した。また、NaCl溶液と人工海水を比較すると、二価の金属イオン(Mg^{2+} , Ca^{2+})が溶存鉄の割合に大きな影響を与えていたことが分かる。

NaCl溶液と人工海水の両ケースで、塩濃度増加に伴い溶存鉄の割合が減少した原因としては、1) フミン鉄が凝集により0.45 μm 以上の粒子状態に変化したこと、2) 水中の金属陽イオンとの競合により鉄がフミン物質から解離して、粒子状態の水酸化鉄フロックを形成したこと、の二点が考えられる。

(2) 粒子状態フミン物質の割合

3.4(1)において、塩濃度増加に伴い溶存鉄の割合は減少したが、その減少がどの程度フミン物質の凝集に影響を受けるか評価するため、平衡時における粒子状態フミン物質の割合と塩濃度の関係を調べた。凝集後における溶存鉄フミン物質炭素濃度は、254nm吸光度から、図3及び図5で示される近似線を用いて変換した。

図9をみると、NaCl溶液中では、粒子状態フミン酸の割合は塩濃度増加に伴い緩やかな増加傾向を示し、30g/Lでは26%を示した。一方、人工海水中では、塩濃度1g/Lで67%ものフミン酸が粒子状態へ変化し、それ以上の塩濃度では76%から82%へ若干の増加を示した。粒子状態フルボ酸の割合と塩濃度の関係を見てみると、NaCl溶液中において、粒子状態フルボ酸の割合は塩濃度増加に伴い若干の増加を示し、30g/Lで9%を示した。一方、人工海水では、塩濃度10g/Lまでに、粒子状態フルボ酸の割合は22%まで増加し、それ以降の塩濃度ではほぼ一定であった。塩濃度30g/Lの人工海水中では、82%のフミン酸が粒子状態へ変化したことを考慮すると、粒子状態フルボ酸の割合はたかだか19%であり、フミン酸の方がはるかに凝集しやすいことが分かる。

フミン物質粒子間に働く主な力は、静電的斥力と分子間引力、疎水性相互作用であると考えられる。本研究で用いた段戸土壌由来フルボ酸及びフミン酸の平均分子量をそれぞれ2.4kDa及び8.4kDaの球体であると仮定とし、また、表面電荷密度を一定とした場合、塩濃度30g/LのNaCl溶液においてDLVO理論から算出した粒子間に働く静電的斥力と分子間引力の和は、分子量の小さいフルボ酸の方がフミン酸よりも大きな引力が働く³⁰⁾。すなわち、この場合にはフルボ酸の方が凝集しやすいこととなり、DLVO理論のみでは本実験におけるフミン酸とフルボ酸の凝集現象を説明することができない。従って、凝集には疎水性相互作用による粒子間の引力が非常に重要な要素であると考えられる。この点については、E254/TOCが高いフミン物質ほど凝集しやすい傾向を示した図5の結果からも明らかである。以上から、フルボ酸よりもフミン酸の方が凝集しやすい要因は、フミン酸分子間に働く疎水性相互作用引力がフルボ酸の場合よりも強かったためだと考えられる。

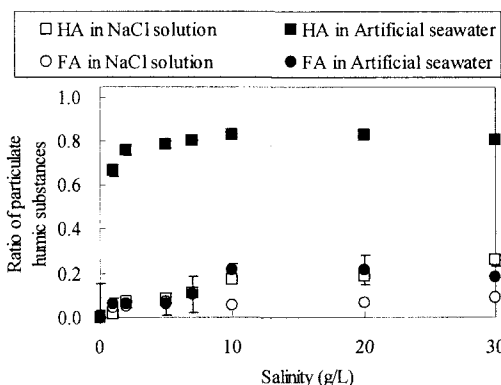


図9. フミン物質と鉄を用いた錯平衡実験により得られた、粒子状態フミン物質の割合と塩濃度の関係。記号は図8と同じである。エラーバーは標準誤差を表す(n=3)。

(3) フミン物質への鉄の吸着量

図10にフミン物質への鉄の吸着量と塩濃度の関係を示した。フミン物質への鉄の吸着量は平衡状態での溶存態フミン物質炭素濃度に対する溶存鉄濃度の比と定義した。図10から、NaCl溶液中ではフミン酸への鉄の吸着量は4.8～5.6 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ であり、塩濃度によって変化せず、一定の値を取っていた。すなわち、図8に示したようにNaCl溶液中でフミン酸鉄の割合が減少した原因は、フミン酸の凝集により溶存態のフミン酸が減少したためである。一方、人工海水中では塩濃度増加に伴いフミン酸への鉄の吸着量が急激な減少(4.7から0.47 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$)を示した。フルボ酸に吸着している鉄量と塩濃度の関係を見てみると、NaCl溶液中の場合、塩濃度10g/L以下においてフルボ酸に吸着している鉄量は4.6～4.4 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ で変化が見られず、以降

塩濃度20、30g/Lではそれぞれ、4.0、3.5 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ と若干の減少を示した。人工海水中では、塩濃度が0から20g/Lに上昇するまでに、4.7から0.31 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ へ指数的な減少を示し、それ以降は変化がなかった。以上の結果から、フミン物質からの鉄の解離は、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の増加によって大きく影響されたといえる。これは、二価のイオン Mg^{2+} や Ca^{2+} が一価のイオン Na^+ より電荷数が大きく、電気的結合力で比較すると Mg^{2+} や Ca^{2+} の方が Na^+ よりも100倍大きい結合能力を持つためだと考えられる²⁷⁾。

塩濃度30g/LのNaCl溶液中におけるフミン酸とフルボ酸に吸着している鉄量はそれぞれ5.2、3.5 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ 、同じく塩濃度30g/Lの人工海水溶液中では0.47、0.31 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ であった。このようにNaCl溶液と人工海水溶液中においてフミン物質への鉄の吸着量が変化すること、また、フミン酸とフルボ酸で鉄の吸着量が異なることは、フミン物質表面には鉄との親和性が異なる多数の官能基が混在するためであると考えられる³¹⁾。フミン物質の官能基は主に、カルボキシル基や水酸基、アミノ基、スルホ基などから構成される³¹⁾。段戸土壌由来フミン物質の元素分析結果から、フミン酸とフルボ酸に含まれるカルボキシル基量はそれぞれ3.7、7.7meq/g、水酸基量は5.6、0.52meq/gであった²¹⁾。一方、窒素の含有量はそれぞれ5.1%、1.7%、硫黄の含有量はそれぞれ0.31%、0.68%であったことから²¹⁾、このフミン物質はアミノ基やスルホ基を有していたと考えられる。HSAB法則(Hard and Soft, Acid-Base Roles)によれば、カルボキシル基や水酸基は硬い塩基に分類され、アミノ基やスルホ基は柔らかい塩基に分類される。一方、遷移金属イオンに属する鉄(Fe^{3+})は柔らかい酸に分類され、柔らかい塩基であるアミノ基やスルホ基と親和性が強い³¹⁾。従って、塩濃度30g/Lの人工海水中で存在するフミン鉄は、アミノ基やスルホ基の官能基と吸着しており、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} との競合に打ち勝つより強い結合力を有していたと考えられる。

鉄との親和性によりフミン物質の官能基をSite 1,2,3に分類する。鉄との親和性を仮にSite1 < Site2 < Site3とすると、HSAB法則から、Site1の多くはカルボキシル基、Site2は水酸基とカルボキシル基、Site3はスルホ基とアミノ基と分類できる³¹⁾。金属イオンが高濃度で存在しているときに、第二鉄イオンと官能基の吸着が1:1であると仮定すると、全官能基に対するSite n (n=1,2,3)の占有率は次式で定義される。

Site 1の占有率 = (酸性度 - 30g/LのNaCl溶液中でフミン物質に吸着している鉄量) / 酸性度

Site 2の占有率 = (30g/LのNaCl溶液中でフミン物質に吸着している鉄量 - 30g/Lの人工海水中でフミン物質から解離した鉄量) / 酸性度

Site 3の占有率 = (30g/Lの人工海水中でフミン物質に吸着している鉄量) / 酸性度

フミン酸とフルボ酸の酸性度はそれぞれ5.9、9.1meq/gであるので、Site n (n=1,2,3)の占有率は表2

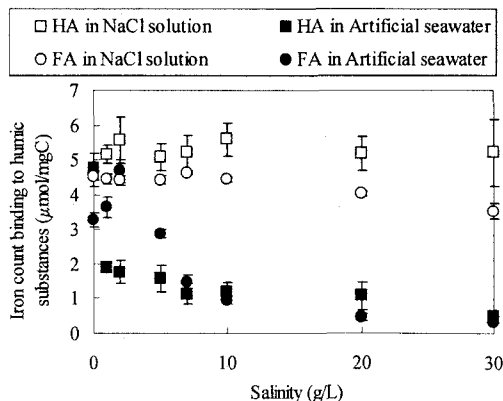


図10. フミン物質と鉄を用いた錯平衡実験により得られた、平衡時にフミン物質に吸着している鉄量と塩濃度の関係。記号は図8と同じである。エラーバーは標準誤差を表す(n=3)。

のように算出される。鉄と最も親和性の高い Site3 に着目すると、フミン酸の Site3 の占有率(7.8%)に比べフルボ酸の Site3 の占有率(2.7%)は低かった。すなわち、河口・沿岸域ではフミン酸の方が鉄吸着能が高いといえる。また、フミン酸が Site3 を多く含むことは、鉄と親和性の高い窒素や硫黄を多く含むという元素分析の結果とも一致していた²¹⁾。

表 2. フミン酸とフルボ酸の Site *n* (*n*=1,2,3) の占有率. HAはフミン酸, FAはフルボ酸を表す. SD は標準誤差を表す(*n*=3).

	The ratio of occupation to total site(%)			
	FA	SD	HA	SD
Site 1	79.3	1.3	50.9	0.4
Site 2	18.0	2.3	41.3	2.2
Site 3	2.7	1.1	7.8	2.5
Total Site	100		100	

3.5 実際の河口域における溶存鉄の挙動

本研究の結果から、河口域において塩濃度が増加するに伴いフミン物質は凝集し、鉄はフミン物質から解離することが明らかとなった。また、これらの挙動はフミン酸とフルボ酸では異なることが示された。フルボ酸は比較的分子量が低く、金属陽イオンが高濃度で存在する河口域においても凝集が起こりにくい。フルボ酸に吸着している鉄の多くは、海水の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} との競合により解離してしまうが、その中でも親和性の強い官能基に吸着している鉄 ($0.31\mu mol/mgC$) は溶存態として存在することができる。一方フミン酸については、河口域でそのほとんどが凝集してしまい、フミン酸に吸着していた鉄も同様に凝集してしまう。一般的な河川中においてフミン物質の 8 割以上をフルボ酸が占めることを考慮すると¹⁷⁾、陸域で発生し、河川を通じて河口域へ供給されるフミン鉄のうち、生物に利用可能な溶存態として存在できるものは、多くがフルボ酸鉄であると考えられる。

海洋学の分野では、鉄と有機物質の錯体形成について、多くの研究が行われている^{10), 32)}。海域におけるバクテリアの代謝物質を由来とする Siderophore は鉄と高い親和性を持つリガンドを有しており、生物に利用可能な溶存鉄の形成に大きく貢献している³²⁾。この時、鉄は Siderophore の hydroxamate や 2-hydroxyphenyloxazoline に含まれる酸素原子や窒素原子を介して結合することが認められている³²⁾。これは、HSAB 法則において、鉄が窒素原子から成る官能基(アミノ基等)と高い親和性を有することと一致する。一方で、Rose(2003)らは陸域由来の 12 種類の NOM(Natural Organic Matter) を用いて第二鉄イオンとの平衡定数を算出したところ、Siderophore に匹敵する強い結合を有していることが分かった¹⁹⁾。以上から、河口・沿岸域において、フミン物質を含む陸域由来の有機物質が鉄のキレート剤として大きく貢献していると考えられる。

4. 結論

本研究では、河口・沿岸域条件下においてフミン物質(段戸森林土壌由来フミン酸及びフルボ酸)と鉄の錯平衡実験を行い、フミン鉄の凝集と錯平衡に関する知見を得た。以下に本研究の結論をまとめる。

1. 溶存態フミン物質について E254/TOC 及び C/N 比を測定した結果、河口・沿岸域条件下では疎水性の強さ及び C/N 比が大きいフミン物質ほど凝集しやすいことが分かった。ゲルクロマトグラフィーを用いた分子量分析の結果から、分子量が高いフミン物質ほど凝集しやすい傾向にあることが明らかとなった。また、フミン酸とフルボ酸の平均分子量はそれぞれ、84kDa、2.4kDa であった。
2. 河口・沿岸域では、塩濃度の増加に伴いフミン物質は凝集し、鉄はフミン物質から解離するため、溶存鉄濃度は急激に減少することが明らかとなった。特に、海水中の二価の金属陽イオンである Mg^{2+} と Ca^{2+} はフミン物質の凝集及び鉄の解離の双方に大きな影響を与えた。その結果、塩濃度 30g/L 人工海水中において、全鉄濃度に対する $0.45\mu m$ 以下の溶存鉄の割合は、フミン酸のケースで 2%、フルボ酸のケースで 12% にすぎなかった。
3. 塩濃度 30g/L の NaCl 溶液中でフミン酸は 19%、フルボ酸は 9% が粒子状態へ変化した。一方、同塩濃度の人工海水中では、フミン酸の場合 82%、フルボ酸の場合 26% が粒子状態へ変化した。このように、フミン酸の方がフルボ酸よりも容易に凝集する要因は、フミン酸の方が疎水性相互作用引力が強いためだと考えられる。

4. フミン酸とフルボ酸の両ケースにおいて、NaCl 溶液中では塩濃度が増加してもフミン物質への鉄の吸着量に大きな変化が見られなかった。しかし、人工海水中においては、鉄の吸着量が塩濃度の増加に伴い指数的な減少を示し、塩濃度 30g/L において、フミン酸とフルボ酸に吸着する鉄量はそれぞれ 0.47, 0.23 $\mu\text{mol}/\text{mgC}$ であった。高塩濃度の海水中でフミン物質と吸着している鉄は、鉄と親和性の強いアミノ基やスルホ基と結合していると予想される。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(A)「豪州 Moreton 湾における毒素生産シアノバクテリアの増殖メカニズムの解明」(研究代表者: 大村達夫)および日本学術振興会オーストラリアとの共同研究「フミン鉄の挙動に着目した河口・沿岸域における生態系評価モデルの構築」(研究代表者: 大村達夫)によって行われたことを報告する。

参考文献

- 1) Turner, R. K. and Adger, W. N. (1996) Coastal Zone Resource Assessment Guidelines. LOICZ Reports and Studies No. 4, LOICZ-IGBP, Texel, The Netherlands, 101.
- 2) Matsunaga, K., Nishioka, J., Kuma, K., Toya, K. and Suzuki, Y. (1998), *Wat. Res.* 32, 3436-3442.
- 3) Lewitus, A. J., Kawaguchi, T., DiTullio, G. R. and Keesee, J. D. N. (2004), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298, 233-254.
- 4) Young, S. L., Seiki, T., Mukai, T., Takimoto, K. and Okada, M. (1996), *Wat. Res.* 30, 1490-1494.
- 5) Gíanesella, S. M. F., Saldanha-Correa, F. M. P. and Teixeira, C. (2000), *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3, 533-544.
- 6) Price, N. M., Andersen, L. F. and Morel, F. M. M. (1991), *Deep Sea Res. Part I*, 38, 1361-1378.
- 7) Fitzwater, S. E., Coale, K. H., Gordon, R. M., Johnson, K. S. and Ondrusek, M. E. (1996), *Deep Sea Res. Part II*, 43, 995-1015.
- 8) Sunda, W. G. and Huntsman, S. A. (1995), *Mar. Chem.* 50 189-206.
- 9) Martin, J. H. and Fitzwater, S. E. (1998), *Nature* 331, 341-343.
- 10) Turner, D. R. and Hunter, K. A. (2001) The Biogeochemistry of Iron in Seawater. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of the Environmental Systems. Vol. 7. John Wiley and Sons Ltd. England.
- 11) Sosik, H. M. and Olson, R. J. (2002), *Deep Sea Res. Part I*, 49, 1195-1216.
- 12) Stumm, W. and Morgan, J. J. (1996), *Aquatic Chemistry*, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- 13) Hutchins, DA, Witter, AE, Butler, A. and Luther, G. W. III. (1999), *Nature* 400, 858-861.
- 14) Perdue, E. H., Beck, K. C. and Reuther, J. H. (1976), *Nature* 260, 418-420.
- 15) 篠塚則子 (1996) 地球環境と計測化学, フミン物質の分離とキャラクターゼーション, 化学総説 29, 73-83.
- 16) Steinberg, E. W. (2003) *Ecology of Humic Substances in Freshwaters*. Springer.
- 17) Thurman, E. M. (1985) Amount of Organic Carbon in Natural Waters. *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Dordrecht, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, pp.7-65.
- 18) Hessen, D. O. and Tranvik, L. J. (1998) *Aquatic Humic Substances: Ecology and Biogeochemistry*, Ecological Studies. Springer.
- 19) Andrew, L. R. and Waite, T. D. (2003), *Mar. Chem.* 84, 85-103.
- 20) Decin, G., Thimedee, W. and Matsunaga, K. (2002), *Mar. Freshwater Res.* 53, 43-47.
- 21) Watanabe, A., Itoh, K., Arai, S. and Kuwatsuka, S. (1994), *Soil. Sci. Plant. Nutri.* 40, 601-608.
- 22) APHA, AWWA and WPCF (2000) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington.
- 23) Stookey, L.L., (1970), *Analytical Chemistry* 42, 779-778.
- 24) Konnonets, M. Yu., Pakhomova, S. V., Rozanov, A. G. and Proskurnin, M. A. (2002), *Anal. Chem.* 157, 586-589.
- 25) Korshin, G. V., Li, C. W. and Benjamin, M. M. (1997), *Wat. Res.* 31, 1787-1795.
- 26) Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H. and Dai, S. (2002), *Chemosphere* 48, 59-68.
- 27) Israclachvili, J. N. (1992) *Intermolecular and surface forces*. Second ed. Academic press Ltd.
- 28) Jahnel, J. B., Frimmel, F. H. (1996), *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 886-888.
- 29) Ertel, J. R., Hedges J. I., Devol A. H., Richey J. E., Ribeiro, M. (1986), *Limnol. Oceanogr.* 31, 739-745.
- 30) 佐々木陽, 藤井学, 渡部徹, 大村達夫, (2004), 環境工学研究論文集 (印刷中)
- 31) Senesi, N. (1992) *Biogeochemistry of Trace Metals*. In *Metal-humic Substance Complexes in the Environment. Molecular and Mechanistic Aspects by Multiple Spectroscopic Approach*, Adriano, D. C. (ed.), Lewis Publisher, 429-496.
- 32) Jennifer, S. M., Jayme, N., Carter F., Elizabeth, L. M., Jessica, D. M., Margo, G. H. and Alison, B. (2003), *PNAS* 100, 3754-3759.